

Leptosphaerulina trifolii에 의한 Kentucky Bluegrass의 Leptosphaerulina 잎마름병 발생

김정호^{1,2} · 심규열¹ · 김영호^{2*}
¹한국잔디연구소, ²서울대학교 농생명공학부

Occurrence of Leptosphaerulina Leaf Blight on Kentucky Bluegrass Caused by *Leptosphaerulina trifolii*

Jeong Ho Kim^{1,2}, Gyu-Yul Shim¹ and Young Ho Kim^{2*}

¹Korea Turfgrass Institute, Subsidiary of Korea Golf Course Business Association, Sungnam 463-840, Korea

²Department of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Seoul 151-921, Korea

(Received on January 29, 2010)

In May of 2004 through 2007, *Leptosphaerulina* leaf blight caused by *Leptosphaerulina trifolii* occurred on Kentucky bluegrass (*Poa pratensis*) at golf courses in Gangwon Province, Korea. Symptoms on the turfgrass caused by *L. trifolii* were leaf blights, dying from the leaf tip downwards to the crown, which appeared patches in the field because of local pockets of severely infected (blighted) grass. Perithecia were produced on old or weak leaves, including club-shaped asci, each of which contained 8 pale brown muriform ascospores with cross and longitudinal septa. Ascospores of the fungus isolated from the diseased leaf tissue and cultured on potato-dextrose agar (PDA) were muriform multicellular (composed of 3-6 cells) and 23.4-40.5×7.8-15.6 μm in size with 3-4 transverse and 0-3 longitudinal septa, which were morphologically identical to *L. trifolii* reported previously. DNA sequences of ribosomal RNA gene (internal transcribed spacer) of the fungus were homologous with similarity of 99% to those of *L. trifolii* isolates in GenBank database, confirming the identity of the causal agent of the disease. Pathogenicity of the fungus was also confirmed on the creeping bentgrass by Koch's postulates. This is first report of *Leptosphaerulina* leaf blight on turfgrass caused by *L. trifolii* in Korea.

Keywords : Identification, Kentucky bluegrass, Leaf blight, *Leptosphaerulina trifolii*

우리나라의 골프장 수는 점차 증가하여 한국골프장경영협회에 따르면 2009년 1월 현재 운영 중이거나 건설 중인 골프장은 439개에 달한다. 국내 골프장의 골프 코스에 사용되는 잔디는 페어웨이와 러프지역 대부분에 한국잔디(*Zoysia japonica*)가 사용되고 있지만 모든 그린은 한지형 잔디인 creeping bentgrass(*Agrostis palustris*)를 사용하고 있고 티잉그라운드에는 대부분 Kentucky bluegrass(*Poa pratensis* L.)로 구성되어 있다. 최근 들어 한지형 잔디는 그 품질의 우수성과 긴 녹색기간, 강한 답압 저항성 등의 장점 때문에 그린과 티잉그라운드 뿐만 아니라 그린칼라

및 에이프론 등 집중 답압 지역에 부분 또는 전면적으로 한지형 잔디 지역이 확대되는 추세이다.

우리나라에서는 한지형 잔디류에 갈색설부소립균핵병(Typhula blight)(김, 1991; 김 등, 2007), 누른잎마름병(yellow patch)(김 등, 1992; 심과 김, 1995), 피티움마름병(Pythium blight)(김, 1997), 동전마름병(dollar spot)(심 등, 2001) 등 많은 병들이 발생하고 있다. 최근 들어 한지형 잔디인 Kentucky bluegrass로 식재한 골프장에서 위의 보고된 병과는 다른 새로운 병의 발생이 빈번해짐에 따라 이 병의 원인을 조사한 결과 우리나라에는 아직 알려지지 않은 *Leptosphaerulina* leaf blight로 밝혀졌다. 이에 본 연구는 Kentucky bluegrass에서 발생한 *Leptosphaerulina* leaf blight의 발생과 그 원인균의 균학적, 분자생물학적 방법을 통한 동정 결과를 보고하고자 한다.

*Corresponding author
Phone) +82-2-880-4675, Fax) +82-2-873-2317
Email) yhokim@snu.ac.kr

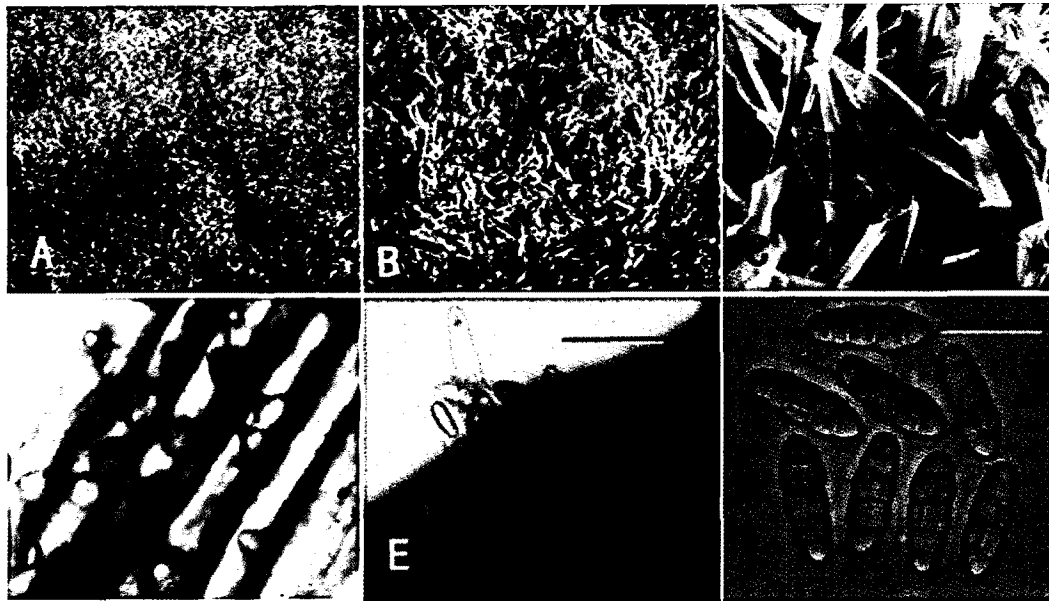


Fig. 1. Symptoms of *Leptosphaerulina* leaf blight on Kentucky bluegrass (A-C) and morphological characters of the causal agent, *Leptosphaerulina trifolii* (D-E). A: Brown-colored patches on turfgrass, B: Local pocket of severely infected (blighted) turfgrass, C: blighted grasses, dying from leaf tips downwards to the crowns, D: Perithecia produced on leaves, E: Ascospores in tunicate asci released from perithecium, F: Ascospores released from tunicate ascus. Bars = 50 μ m (E) and 20 μ m (F).

병 발생과 증상. 2004-2007년 7월에 강원도 소재의 한 골프장에 Kentucky bluegrass로 조성된 페어웨이 및 러프의 대취(thatch)가 과도하게 축적되어 배수가 불량한 지역에서 불규칙한 패치(patch) 형태의 잎마름병이 발생하였다(Fig. 1A). 병의 초기 증상은 잎의 선단부가 갈색으로 변색되고 병든 부분이 수침상으로 갈변하면서 고사하여 고온 장애 및 서리 피해와 유사한 증상을 보였다(Fig. 1B, C). 병이 진전됨에 따라 병든 부분에 담갈색의 자낭각(perithecia)이 주로 노엽에서 다량 형성되었고(Fig. 1D), 이들 자낭각 내에는 다수의 자낭이 형성되었다(Fig. 1E). 자낭에서 방출된 자낭포자의 형태는 장타원형으로 여러 개의 횡격벽(transverse septum)과 종격벽(longitudinal septum)을 가진 다수의 세포로 구성되어 있었다(Fig. 1F). 병징 부위에서 무성세대와 관련된 포자는 발견되지 않았다.

병원균 분리과 동정. Kentucky blue grass의 이병엽을 채취하여 70% EtOH에 1분간 표면살균 하고 살균수로 씻은 후 멸균된 거름종이(Whatman No. 1)에 올려놓아 수분을 제거하고 water agar(WA)에 치상하여 25°C 항온기에서 배양하였다. 배지 위 이병엽 조각에서 자라난 균사의 끝부분을 떼어내어 감자한천배지(potato-dextrose agar, PDA)에 이식하여 시험균주로 사용하였다. 병원균을 동정하기 위해 PDA에서 25°C 약 30일간 자란 균총을 떼어내어 광학현미경하에서 병원균의 자낭포자 크기와 모양, 격막 등 형태적 특징을 관찰하였다.

Table 1. Comparison of morphological characteristics of the causal fungus (present isolate) for *Leptosphaerulina* leaf blight and *Leptosphaerulina trifolii* described previously

Characters	Present isolate	<i>L. trifolii</i> ^a
Shape	Ellipsoid (muriform)	Ellipsoid (muriform)
Size (μ m)	23.4-40.5×7.8-15.6	28-35×11-15
Ascospore	No. of transverse septa	3~4 (usually 4)
	No. of longitudinal septa	0~3 (usually 1)
		3~4
		0~2

^aDescribed by Irwin and Davis (1985).

PDA에서 배양한 결과 균사 색깔은 검은색으로 균사생육이 왕성하지 않았고 배양기간이 지남에 따라 배지 표면에 검은색의 자낭각이 형성되었다. 자낭포자의 모양은 장타원형으로 크기는 23.4-40.5×7.8-15.6 μ m이었고, 횡격벽은 3~4개, 종격벽은 0~3개였다(Table 1). 이와 같은 병원균의 형태적 특성은 Irwin과 Davis(1985)가 보고한 *Leptosphaerulina trifolii*의 형태적 특징과 일치하였으며, 또한 여러 한지형 잔디류에서 발생하고 있는 *Leptosphaerulina* leaf blight의 원인균인 *L. trifolii*의 형태적 특징과도 일치하였다(Smiley 등, 1992).

분자생물학적인 동정을 위해 분리균을 25°C 항온기에서 7일간 배양한 후 Zhou 등(2007)의 방법에 따라 DNA

를 추출하고 ITS 1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'), ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGAT ATGC-3') 프라이머로 TP650 Standard TaKaRa PCR Thermal Cycler(TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan)를 이용하여 분리균의 ribosomal RNA 유전자의 internal transcribed spacer (ITS) 유전자를 증폭하고 클로닝하여 서울대학교 농생명과학공동기기원(NICEM)에서 Applied Biosystems DNA Sequencer (model ABI 3700)를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 이 염기서열은 NCBI BLAST를 이용하여 GenBank database에 나타난 ITS 염기서열과 비교하여 분리균을 동정하였다.

그 결과 분석된 DNA 염기서열 512 bp 중 508 bp 염기서열이 Gene bank database에 나타난 *L. trifolii*의 ITS-1 (accession no. AY131203.1, AY831558.1)과 일치하여 99%의 상동성을 보였다. 이상의 결과로 이 병의 원인균이 *L. trifolii*로 최종적으로 동정되었다.

병원성 검정. 병원성을 검정하기 위하여 Kentucky bluegrass 대신 감수성이 높은 creeping bentgrass를 이용하였다. 순수분리한 병원균 배양에서 형성된 자낭포자를 5×10^3 ascospores/ml 농도로 포자 현탁액을 만들어 잔디에 분무 접종한 다음, 성장상(growth chamber)(25°C, 상대습도 95%)에서 재배하면서 병 발생을 조사하였다. 그 결과 인공 접종한 creeping bentgrass는 감염 초기에 잎의 선단부가 갈변하고 이병부위가 수침상으로 부분이 수침상으로 갈변하면서 고사하였고, 이병엽에는 자낭각이 형성되었다(자료미제시). 시간이 경과됨에 따라 자연 감염되어 발생한 것과 동일한 병반이 형성되었다. 인공 접종하여 발생한 병반부에서 다시 병원균을 재분리하여 동정한 결과 자낭포자의 형태와 크기 및 종격벽과 횡격벽 수가 접종한 균과 일치하여 동일한 균으로 확인되었다.

따라서 본 병은 한지형 잔디류(켄터키블루그래스)에서 처음 발생이 확인된 병으로서 *Leptosphaerulina trifolii*에 의한 *Leptosphaerulina* leaf blight로 국내에서 처음으로 보고하고 한글병명은 '렙토스페룰리나 잎마름병'으로 제안한다. 잔디류에 마름병을 일으키는 *Leptosphaerulina* 속에는 여러 종이 알려져 또한 있으나 가장 흔한 종은 *L. trifolii*이다(Graham과 Luttrell, 1961). 골프 코스의 creeping bentgrass에서는 본 병의 발생이 확인되지 않았지만, 인공

접종 실험에서 병 발생이 확인되었으므로 우리나라 골프장에 있는 creeping bentgrass에도 발생할 가능성이 있다고 판단된다. *L. trifolii*는 병원성인 약한 일반적 토양부생성균으로 여러 작물의 약하거나 노쇠한 조직에 병을 일으키는 것으로 알려져 있는데(Smiley 등, 1992), 대취(thatch)가 과도하게 축적된 배수 불량 지역에서 집중적으로 발생하였다. 따라서 이 병의 예방과 방제를 위해서는 잔디의 생육에 양호한 환경이 조성되도록 재배관리에 유의하여야 할 것이다.

참고문헌

- Graham, J. H. and Luttrell, E. S. 1961. Species of *Leptosphaerulina* on forage plants. *Phytopathology* 51: 680-693.
- Irwin, G. A. and Davis, R. D. 1985. Taxonomy of some *Leptosphaerulina* spp. on legumes in eastern Australia. *Aust. J. Bot.* 33: 233-237.
- 김정호, 심규열, 이혜민, 문호선, 김영호. 2007. 우리나라의 골프 코스에서 *Typhula* spp.에 의해 발생하는 설부병의 동정 및 방제. *한국잔디학회지* 21: 147-154.
- 김진원, 심규열, 김호준, 이두형. 1992. 잔디의 잎마름병증상(yellow patch)을 일으키는 2핵성 *Rhizoctonia*의 동정 및 병원성. *한국잔디학회지* 6: 99-112.
- 김진원. 1991. 우리나라 골프장의 bentgrass와 Kentucky bluegrass에 발생한 *Typhula incarnata* Lasch ex Fr.에 의한 설부소립균핵병에 관한 연구. *서울시립대 석사논문*.
- 김진원. 1997. 우리나라 골프장 잔디에서 분리한 *Pythium* spp. *한국균학회지* 25: 276-290.
- 심규열, 김희규. 1995. 골프장 잔디에 병을 일으키는 *Rhizoctonia*의 동정 및 병원성. *한국잔디학회지* 9: 235-252.
- 심규열, 민규영, 신현동, 이현주. 2001. *Sclerotinia homoeocarpa*에 의한 잔디동전마름병(Dollar spot)의 약제 저항성균 발생 및 방제. *한국잔디학회지* 15: 1-8.
- Smiley, R. W., Dernoeden, P. H. and Clarke, B. B. 1992. *Compendium of Turfgrass Diseases*, Second Edition. APS Press, The American Phytopathological Society. 98 pp.
- Zhou, X., Li, Q., Zhao, J. and Tang, K. 2007. Comparison of rapid DNA extraction methods applied to PCR identification of medicinal mushroom *Ganoderma* spp. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 37: 369-380.